

10/528992

Rec'd PCT/PTO 24 MAR 2005

PCT/JP03/11766

10.10.03

#2

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2002年10月24日

REC'D 27 NOV 2003  
WIPO PCT

出願番号 Application Number: 特願2002-309734

[ST. 10/C]: [JP2002-309734]

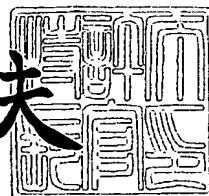
出願人 Applicant(s): アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3094124

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 186565  
【提出日】 平成14年10月24日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 9/06  
C12Q 1/26  
C12R 1:77

## 【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市学園南3丁目15-35 学園南ハイツ1  
02号

【氏名】 吉田 信行

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市北区上賀茂菖蒲園町56, 60番合地-1

【氏名】 谷 ▲吉▼樹

## 【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 米原 聰

## 【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100062144

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葵

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100087114

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 みの里

## 【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-277214

【出願日】 平成14年 9月24日

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証（写） 1

【援用の表示】 特願2002-277214で提出のものを援用する。

【包括委任状番号】 9702569

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フルクトシルアミンオキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*)

由来のフルクトシルアミンオキシダーゼ。

【請求項2】 フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*)

由来の酵素であって、次に示す理化学的特徴を有するフルクトシルアミンオキシダーゼ。

① フルクトシルバリンに対する活性が、フルクトシルリジンに対する活性とほぼ同等か若しくはそれよりも高い。

② 酵素反応における至適pHが7.5である。

③ 酵素の安定性に好適な温度が約30～40℃である。

④ SDS-PAGEによる分子量が約39kDaであって、ゲルfiltrationによる分子量が約39.4kDaである。

【請求項3】 フサリウム プロリフェラタム由来の酵素であって、次に示す理化学的特徴を有するフルクトシルアミンオキシダーゼ。

① フルクトシルリジンに対して検出可能な活性がなく、フルクトシルバリンに対する活性がある。

② 酵素反応における至適pHが7である。

③ 酵素の安定性に好適な温度が約30～40℃である。

④ SDS-PAGEによる分子量が約49kDaであって、ゲルfiltrationによる分子量が約58kDaである。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の酵素を生産することを特徴とする、フサリウム プロリフェラタム (FERM P-19005)。

【請求項5】 請求項1～3のいずれかに記載の酵素を用いることを特徴とする、試料中に含まれるアマドリ化合物を測定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なフルクトシルアミノキシダーゼに関し、さらに詳しくは、  
フサリウム プロリフェラタム由来のフルクトシルアミノキシダーゼに関する  
。

### 【0002】

#### 【従来の技術】

アマドリ化合物は、血液や食品中のタンパク質、ペプチドおよびアミノ酸のようないくつかのアミノ基を有する物質と、例えばグルコースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ不可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができることから、アマドリ化合物の分析は、医療分野、食品分野等で有用である。特に医療分野で注目されているのは、糖尿病の診断および管理の指標としての糖化タンパクである。糖尿病は、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害を初め様々な全身症状（合併症）を引き起こす疾患であり、失明や透析導入の最も主要な原因となっている。これらの合併症は、患者の生活や社会活動を制限するばかりか医療費の増加にもかかわっており、深刻な社会問題である。従って、糖尿病の早期発見と発見後の適切な血糖コントロールの重要性が指摘されている。糖尿病における血糖コントロールの指標として、通常、過去約1～2ヶ月の平均血糖値を反映する糖化ヘモグロビン、過去約2週間の平均血糖値を反映する糖化アルブミン、あるいは血清中の還元能を示す糖化タンパク質を意味するフルクトサミン等が測定される。糖化ヘモグロビン（HbA1c）はヘモグロビンのβ鎖N末端バリンのα-アミノ基が糖化されたものであり、HbA1cの測定は糖尿病患者の血糖コントロールにおいて重要な役割を占めている。

### 【0003】

アマドリ化合物の酵素法による分析は、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、生成する過酸化水素量または消費される酸素量に基づいて、その量を測定することで行われる。該酸化還元酵素の一つであるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、通常、微生物から精製されている（例えば特許文献1～6参照）。こ

これらの文献に記載の酵素について簡単に説明すると、コリネバクテリウム属(Corynebacterium) 属由来の酵素には  $\alpha$ -アミノ基糖化アミノ酸に特異的であり、フルクトシルリジン（以下、「F L」と称することもある）には作用しないものがあるが、これは熱安定性が悪く（45℃、10分の熱処理で90%以上失活）実用性に乏しい（特許文献1参照）。アスペルギルス属(Aspergillus)由来の酵素には、F Lに対する活性が、フルクトシルバリン（以下、「F V」と称することもある）に対する活性より低いものがあるが、その糖化タンパクまたはその加水分解物に対する作用については不明である（特許文献2参照）。ギベレラ属(Gibberella)属由来の酵素には  $\alpha$  アミノ基が保護された、フルクトシルN  $\alpha$ -Z-リジン（以下、F Z Lと称することもある）に対して高い特異性を有し、フルクトシルポリリジンに対して活性があるが、フルクトシルバリンには作用しないものがある（特許文献3参照）。また、フサリウム属 (Fusarium) が産生する酵素にはフルクトシルリジンに対する活性がフルクトシルバリンに対する活性と同等かより高いものがある（特許文献4参照）。また、他のフサリウム属 (Fusarium) やギベレラ属(Gibberella)から産生される酵素にはフルクトシルバリンには作用せず、フルクトシルリジンに特異的なものもある（特許文献5参照）。

#### 【0004】

##### 【特許文献1】

特公平6-65300号公報

##### 【特許文献2】

特開平3-155780号公報

##### 【特許文献3】

特開平7-289253号公報（段落番号0031、0037）

##### 【特許文献4】

特開平8-154672号公報（請求項2、段落番号0027）

##### 【特許文献5】

特開平11-243950号公報（段落番号0037）

##### 【特許文献6】

特開平5-192193号公報

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、既存の酵素では、例えば糖化ヘモグロビンの測定に充分満足できないことから、活性が高く、特異性に優れた酵素が望まれていた。さらに、これら既存の酵素では、プロテアーゼ処理等により断片化処理された糖化アミノ酸や糖化ポリリジンに対する活性は認められるが、 $\alpha$ 位が糖化された糖化ペプチドに対する活性は殆ど認められない。従って、例えば、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基をN-末端に有する糖化ヘモグロビンの場合は、N-末端のフルクトシルバリンを確実に遊離させる必要がある。従来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて糖化タンパクを正確に測定しようとする場合には、該酵素の基質となる糖化アミノ酸を確実に遊離させることが前提となるが、実際には、目的の糖化アミノ酸を確実に遊離させる方法はなく、それを可能にするほど特異性の高いプロテアーゼも提供されていない。この問題を解決する一つの方法は、N末端が糖化されたペプチドに反応し得るフルクトシルアミノオキシダーゼを測定に使用することである。とりわけ糖尿病のコントロールに重要なヘモグロビンA1c (HbA1c) を正確かつ効率良く測定するには断片化産物としての糖化ペプチドにも活性なフルクトシルアミノオキシダーゼが必要である。

従って、本発明はアマドリ化合物、特に糖化タンパクを正確かつ効率良く測定するために、新規で有用なフルクトシルアミノオキシダーゼ（以下、「FAO」と呼称することもある）を提供することを目的するものである。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

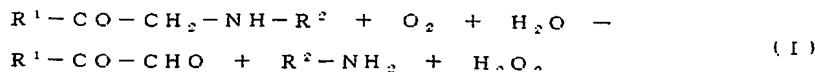
本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、フサリウム (Fusarium) 属の菌株が基質特異性において優れたFAOを産生することを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、フサリウム プロリフェラタム (Fusarium proliferatum) 由来のフルクトシルアミノオキシダーゼを提供するものである。

本発明のフルクトシルアミノオキシダーゼは、以下の式（1）で示される反応における触媒活性を有する。

式(I)：

【化1】



(式中、R<sup>1</sup>は-[CH(OH)]<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>OH (nは5または6である)、R<sup>2</sup>はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基を表す。)

【0007】

【発明の実施の形態】

上記の式(I)において、R<sup>2</sup>はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基であり、好ましくは、アミノ酸残基またはアミノ酸2～6個のペプチド残基、より好ましくはアミノ酸残基またはアミノ酸2～3個のペプチド残基である。

R<sup>2</sup>を構成するアミノ酸は測定すべきアマドリ化合物により異なるが、例えば、バリン、リジン、ヒスチジン、ロイシン、セリンを挙げることができる。R<sup>2</sup>がペプチド残基である場合は、バリンまたはロイシンをN-末端に含む2～10個のアミノ酸からなるペプチド残基である。バリンをN末端に有するアミノ酸数2～3個のペプチド残基がより好ましく、そのようなペプチドの具体例として、バリン-ヒスチジン、バリン-ヒスチジン-ロイシンが挙げられる。

【0008】

本発明のFAOがHbA1cの測定に用いられるものである場合、上記のごとく、α-アミノ基が糖化されたバリン、即ちフルクトシルバリン(FV)、またはFVをN末端に有するペプチドに対して活性があることが好ましい。一方、糖化アルブミンの測定に用いられるものである場合、糖化アルブミン分子ではリジンのε-アミノ基が糖化されていることから、ε-アミノ基が糖化されたフルクトシルリジン(εFL)またはεFLを含むペプチドに対して活性があることが好ましい。

【0009】

本発明のFAOは、酵素作用を有する限りその起源は特に制限されない。例え

ば、特定の糖化アミノ酸または糖化ペプチドのみを炭素源および窒素源として含有する培地で成育する微生物により產生され、糖化アミノ酸および糖化ペプチドを基質として酵素活性を發揮するFAOは本発明に有用である。上記の微生物のスクリーニングに用いる糖化ペプチドとしては、目的の糖化タンパクを断片化した場合に生成されるものが例示される。そのような糖化ペプチドのみを炭素源および窒素源とする培地で培養した菌体より酵素を精製し、その活性を確認することにより、目的のFAOを得ることができる。後述するように、本発明者らはフルクトシルバリン-ヒスチジン-ロイシン(FVHL)を用いて土壌中の微生物をスクリーニングし、FVHL資化能を有する、フサリウム属(Fusarium)の微生物を見出した。

なお、上記のFVHLは、ヘモグロビン $\beta$ 鎖のN末端と同じ配列を有していることから、該ペプチドはHbA1cの測定に有用なFAOをスクリーニングするのに好適である。そのような糖化ペプチドは当該技術分野で既知の方法で製造することができる。

#### 【0010】

従って、本発明のFAOはフサリウム属の菌株を用いて微生物学的に製造することができる。好ましい微生物はフサリウム プロリフェラタム(Fusarium proliferatum)またはその変異体である。

フサリウム プロリフェラタム(Fusarium proliferatum)は、実施例1に記載の方法により、本発明者らが土壌中から新たに分離した菌株であり、「Fusarium sp. GL2-1株」と表記して、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM P-19005の下で寄託されている(受託日：平成14年9月9日)。本発明のフサリウム プロリフェラタム(Fusarium proliferatum)を、以下、「GL2-1株」とも表記する。

#### 【0011】

GL2-1株を元株として、変異体誘導や組換え遺伝子技術などにより、FVHLや他の基質に対する活性が高められた派生菌株を得ることができる。そのような変異株も本発明のFAOの供給源である。そのような派生菌株は、人為的に突然変異を誘発されたものや、スクリーニングで得られたもの等を包含する。

## 【0012】

本発明のF A Oは、グルコース-バリン褐変化培地（以下、G V褐変化培地と称する）でF A O產生能を有する微生物を培養すると、生産される。G V褐変化培地は、グルコースとバリンを温度120℃において30分間、オートクレーブ処理することにより得られる。好ましいG V褐変化培地の例として、グルコース1.5%、L-バリン0.5%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%、酵母エキス0.2%を含有する培地を挙げることができる。

## 【0013】

培養は、通常、25～37℃、好ましくは28℃で行われる。培地のpHは4.0～8.0の範囲であり、好ましくは5.5～6.0である。しかしながら、これらの条件は、それぞれの菌の状態に応じて適宜調整されものであり、上記に限定されない。

例えば、GL 2-1株をこのような条件下、12～36時間、好ましくは24時間培養すると、F A Oが菌糸体内に蓄積される。したがって、ろ過により回収した菌糸体を定法に従って遠心分離すれば無細胞抽出液を得ることができる。細胞の磨碎は、機械的手段または溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧などのいずれでもよい。

## 【0014】

酵素の分離精製法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィやゲルろ過、アフィニティーコロマトグラフィなどを、適宜組み合わせて行う。

例えば、培養物を、遠心または吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、1mM DTTを含む0.1M Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）に懸濁し、ミニビードビータ（ガラスビーズ0.5mm）で菌糸体を破碎し、遠心分離して得た上清（無細胞抽出液）を硫酸分画し、透析した後、Resource Q カラムクロマトグラフィー（アマシャムバイオシステムズ社製）で処理することにより精製する。

## 【0015】

あるいは、F A Oが培地中に分泌または蓄積される場合は、それ自体既知の方

法に従い、例えば、イオン交換樹脂処理法、活性炭吸着処理法、有機溶媒沈澱法、減圧濃縮法、凍結乾燥法、結晶化法等を適宜組み合わせて分離精製することができる。

#### 【0016】

以上に述べた方法で、GL2-1株の培養物から、Resource Qカラムクロマトグラフィーで異なる保持時間を示す、少なくとも2種類の、GL2-1株由来のFAOを得た。1つはフルクトシルバリン(FV)およびN- $\alpha$ フルクトシルリジン(FZL)の両方に活性な酵素(以下、「FAO-Q1」と称する)であり、他方はFVには活性があるが、FZLには活性を示さない酵素(以下、「FAO-Q2」と称する)である。なお、本明細書では、GL2-1株が産生するFAO-Q1, FAO-Q2についてその製造や同定に関して記載しているが、本発明は特定の起源に限定されず、本発明の目的に適う、下記の特性を有する全FAOを包含する。

#### 【0017】

本発明のGL2-1株由来の酵素について以下に詳細に説明する。

##### FAO-Q1

- ① フルクトシルバリンに対する活性が、フルクトシルリジンに対する活性とほぼ同等か若しくはそれよりも高い。
- ② 酵素反応における至適pHが7.5である。
- ③ 酵素の安定性に好適な温度が約30~40℃である。
- ④ SDS-PAGEによる分子量が約39kDaであって、ゲルfiltrationによる分子量が約39.4kDaである。

##### FAO-Q2

- ① フルクトシルリジンに対して検出可能な活性がなく、フルクトシルバリンに対する活性がある。
- ② 酵素反応における至適pHが7である。
- ③ 酵素の安定性に好適な温度が約30~40℃である。
- ④ SDS-PAGEによる分子量が約49kDaであって、ゲルfiltrationによる分子量が約58kDaである。

## FAO-Q2

## 【0018】

これら2つの酵素の一般的な特性は以下の通りである。

## 1. 一般的な誘導特性

いずれもFVLによって誘導される酵素であり、FVLを唯一の炭素源および窒素源とする培地で誘導される。

## 【0019】

## 2. 反応特異性および基質特異性

GL2-1株の培養物から部分精製した酵素は、実施例2(1)に記載されているように、Resource Qカラムクロマトグラフィーにおいて、異なる保持時間を示す活性な画分Q1、Q2を含んでいた。これら画分に含まれる酵素を本明細書中では「FAO-Q1」とおよび「FAO-Q2」と呼称する。上で述べたように、FAO-Q1はFVおよびFZLの両方に同程度の活性を有し、かつFVLにも活性であり、他方、FAO-Q2はFVには活性であり、FVH、FVHLというN-末端バリンが糖化されたペプチドにも活性を示したが、FZLには活性を示さなかった。

## 【0020】

## 3. pHおよび温度の条件

至適pHの検討

前記活性測定法方法に準じ、pH3.5から10.0の範囲の各pH条件により酵素反応を行った。

ただし、使用したバッファーはpH3.5から6.0の範囲では100mM酢酸バッファー、pH6.0から8.0の範囲では100mMリン酸カリウムバッファー、pH7.0から9.0の範囲では10.0mMトリス-塩酸バッファー、pH9.0から10.0の範囲では100mMグリシン-NaOHバッファーであった。図2および図3に示す通り、本発明の酵素FAO-Q1の至適pHは、30℃において約7.5であることが、FAO-Q2の至適pHは、30℃において約7.0であることが、判明した。

### 酵素の安定性に好適な温度の検討

酵素の温度条件は、0.1M Tris-HCl緩衝液（pH 8.0）中で30～65℃の温度条件にFAO-Q1またはFAO-Q2を加え、10分間インキュベートした後、通常の条件で活性を測定し、判定した。測定結果を図4および図5に示す。これらの図より、酵素の安定性に好適な温度範囲は30℃から40℃であることが判明した。

#### 【0021】

##### 4. 力価の測定

酵素の力価測定は、例えば、実施例1（3）に記載されている、当該技術分野で既知の方法（速度法）で行うことができる。この方法では、FAOと糖化アミノ酸または糖化ペプチドとの反応によって生成する過酸化水素を、該過酸化水素の存在下で生成するキノン色素による吸光度（505nm）に基づいて測定する。キノン色素の分子吸光係数 $5.16 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$ から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位（ユニット：U）とする。

なお、活性の測定は上記の方法に限定されず、その他の方法（終末法、または酸素吸収量を測定する方法等）を用いても同様に本発明のFAOの酵素活性を測定することができる。

##### ミハエリス定数の測定

上記の力価測定法において、酵素濃度、pH、温度などの条件を一定に保ち、基質の濃度だけを変化させながら反応の初速度を測定し、各基質に対するミハエリス定数を求めることができる。

#### 【0022】

本発明のFAOのうち、FAO-Q1はFVおよびFZLにほぼ同程度の活性を示すことから、広くアマドリ化合物の分析に有用である。一方、FAO-Q2はFVに活性があるがFZLには活性を示さないことから、糖化ヘモグロビンを選択的に分析するのに有用である。しかも、FAO-Q2は、糖化ヘモグロビンのN-末端配列であるFVH, FVHLにも活性を示したことから、該酵素を用いれば、糖化ヘモグロビン内部の糖化（ε位）を測定することなく、N末端の糖

化のみを測定することができるため、より正確にHbA1cの測定が行える。

#### 【0023】

本発明のFAOを用いて糖化タンパク等のアマドリ化合物を分析するには、既知の方法に従い、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明のFAOとを接触させ、酸素の消費量または過酸化水素の発生量を測定すればよい。任意の試料を用いることができ、例えば、血液（全血、血漿または血清）、尿等に代表される生体由来の試料の他、醤油等の食品が挙げられる。特に好ましいのは血液である。

#### 【0024】

本発明のFAOの使用に際して、反応溶液のpHおよび温度は、それぞれ、使用する酵素に適した条件とする。即ち、FAO-Q1の場合、pH約6.5～12、好ましくは約7～8、より好ましくは約7.5、温度約30～40℃で行う。

また、FAO-Q2の場合、pH約6～10、好ましくは約6.5～8、より好ましくは約7、温度約30～40℃で行う。但し、基質や他の反応条件により適宜変更が可能であり、上記に限定されない。

FAOの使用量は、それぞれ、使用する測定法により適宜選択することができるが、通常、0.1ユニット/ml以上、好ましくは1～100ユニット/mlである。緩衝液としてはTris-HCl等を用いる。

#### 【0025】

本発明のFAOで糖化タンパクを分析するには、あらかじめ断片化処理し、糖が結合したアミノ酸残基またはペプチドを遊離させてから行うことが好ましい。そのような方法は化学的な方法、酵素を用いる方法を含めて、当該技術分野で既知である。しかしながら、本発明のFAO、特にFAO-Q2の場合は、糖化アミノ酸のみならず糖化タンパクの分解産物としての糖化ペプチドにも活性があるため、上記の断片化処理が完璧でなくても良好な精度で測定することができる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0026】

##### 【実施例】

###### 実施例1 FAO産生微生物のスクリーニングと同定

## (1) FAO产生微生物のスクリーニング

糖化ヘモグロビンの $\beta$ 鎖N末端配列を持つフルクトシルバリンーヒスチジンーロイシン(FVHL)を、VHLのグリコシル化により調製した。そのような方法は当業者に既知である。

このFVHLを单一の炭素源および窒素源とする培地(FVHL培地)を用いて、土壤よりFVHL資化性菌を分離した。試験管(16.5mm径)にFVHL培地5mlを入れ、採取した土壤を添加して30℃で48時間、振盪(300rpm)培養した。

## (FVHL 培地)

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| FVHL                                  | 5 g        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 1 g        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1 g        |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0.5 g      |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.1 g      |
| ビタミン混合物*                              | 0.1% (v/v) |
| 金属溶液**                                | 1.0% (v/v) |
| 蒸留水                                   | 適量         |
| 全量                                    | 1,000ml    |

## (\*ビタミン混合物)

|             |        |
|-------------|--------|
| チアミンHCl     | 1 mg   |
| リボフラビン      | 2      |
| パントテン酸カルシウム | 2      |
| ピリドキシンHCl   | 2      |
| ビオチン        | 0.1    |
| p-アミノ安息香酸   | 1      |
| ニコチン酸       | 2      |
| 葉酸          | 0.1    |
| 蒸留水         | 適量     |
| 全量          | 100 ml |

( \*\* 金属溶液 )

|  |          |
|--|----------|
| MnSO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O                | 1.7 g    |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                | 2.2      |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                | 0.4      |
| CoCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O                | 0.28     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.26     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0.4      |
| KI   | 0.06     |
| 蒸留水  | 適量       |
| 全量   | 1,000 ml |

その結果、F V H L を資化する 13 株を得た。それらを下記の培養、活性確認に供し、F A O 活性を有する物質を產生する菌株をさらに選抜した。

## 【0027】

## (2) 培養および無細胞抽出液の調製

上記 (1) で得た 13 株をグルコース-バリン (G V) 褐変化培地で培養し、粗酵素液を調製した。

## (G V 褐変化培地)

|                                       |             |
|---------------------------------------|-------------|
| グルコース                                 | 1.5 % (w/v) |
| L-バリン                                 | 0.5         |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 0.1         |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0.1         |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0.05        |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.01        |
| 酵母エキス                                 | 0.2         |

試験管 (16.5 mm 径) に G V 褐変化培地 5 ml を入れ、30℃で 24 時間、振盪培養 (300 rpm) した。次いで、フィルターでろ過して菌糸体を回収し、ミニビードビータ (ガラスビーズ 0.5 mm) で菌糸体を破碎し、遠心分離 (4℃、10,000 × g、10 min) して無細胞抽出液を調製し、粗酵素液として使用した。

## 【0028】

## (3) F A O活性の測定

粗酵素液のF A O活性を前記の速度法で測定した。即ち、以下の混合物中で生成する過酸化水素を比色法で経時的に測定し、F A O活性を確認した。

|                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) | 100 $\mu\text{mol}$ |
| 4-アミノアンチピリン          | 4.5 $\mu\text{mol}$ |
| フェノール                | 6 $\mu\text{mol}$   |
| F V                  | 5 $\mu\text{mol}$   |
| パーオキシダーゼ             | 6 units             |
| 粗酵素液 (無細胞抽出液)        | 1 ml                |
| 全量                   | 3 ml                |

酵素液以外の混合物（全量3ml）を30℃で平衡化した後、酵素液を添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数 ( $5.16 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位（ユニット：U）とした。その結果、F A Oを有する1つの株を得た。

## 【0029】

## (4) 株の同定

菌学的性質

ポテトデキストロース寒天 (PDA)、オートミール寒天 (OA)、および2%麦芽寒天培地 (MEA) の各プレートに播種後、25℃で最長8週間培養し、菌学的特性を観察した。コロニーの色調に関する記述はKomerup & Wanscher (1978) に従った。

## (コロニーの巨視的特徴の観察)

- 全縁が滑らかで僅かに、凸状の盛り上がりを示した。

気中菌糸 (aerial hypha) は綿毛状で、コロニー表面の色調は当初より、White-reddish white (11A1-2) を示した。その後、8週間経過後も明らかな呈色度合いの変化、および分生子 (conidia) の着生による表面色調の変化は観察されなかった。

・コロニー裏面の色調は表面とほぼ同等で、PDA、MEA培地における長期間の培養では、若干pale red (11A3)呈色が観察された。また、PDA、OAプレートからは、僅かに透明な滲出液 (exudate) の産生が認められた。

(コロニーの微視的観察)

・小型分生子 (microconidia) と大型分生子 (macroconidia) の両方が観察された。

・小型分生子は、フィロア型 (phialidic) でAcremonium属様の分生子柄 (conidiophore) の構造であった。分生子柄はほぼ単生で時折り2軸に分枝し、気中菌糸の全般にかけて生じた。1～2細胞性で粘性を持っており、柄先端より塊状となった。形状は楕円形 (ellipsoidal) から紡錘形 (fusiform) で、表面は平滑 (smooth) からやや粗面 (slightly rough) であった。

・大型分生子はFusarium属の大型分生子の形態で、3～6細胞性で三日月型 (luniform) で、表面は平滑、脚胞 (footcell) を有した。気中菌糸部に中厚からやや細く、短いものが多く観察された。また、細胞壁が脆弱で、大半の大型分生子は表面が欠損していた。

【0030】

Arx (1974)、Domish (1993) および Malloch (1981) に記載されている分類体系に基づいて、上記の結果を考察し、本菌体はFusarium属に帰属すると推定された。同様の形態を示すものにCylindrocarpon、Candelabrella、Monacrosporium、Trichophoron等が挙げられるが、本菌体は大型分生子が三日月型であること、気中菌糸が輪 (ring) を形成しないこと、また、小型分生子を形成すること、等からこれらとは区別され、“Gene of Hyphomycetes” (Carmichael et al., 1980) に記載のFusarium属の定義に合致するものである。

この菌株は「Fusarium sp. GL2-1株」と表記し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託を行っている。(受託日：平成14年9月9日受託番号F E R M P-1900)。

【0031】

種の同定 (リボソームの塩基配列の解析)

上記GL2-1株の18SリボソームDNA (18S rDNA) 配列を調べる

ことにより同定を試みた。

上記（2）に記載の培養方法に従ってG L 2-1株をG V培地で培養し、得られた菌糸体から常法によりDNAを調製した。その後、このDNAを鋳型として、PCRでr DNAの内部転写スペーサー（Internal transcribed spacer）配列を増幅し、塩基配列を解析した（Mycopathologia Vol. 140 P35~49 1997参照）。その結果、配列番号1に示す塩基配列が確認された。この塩基配列をホモロジー検索したところ、フサリウム プロリフェラタムと100%のホモロジーがあることが判明した。

### 【0032】

#### 実施例2 GL 2-1株を用いるFAOの生産と同定

##### （1）FAOの部分精製

###### 1) 培養と無細胞抽出液の調製

実施例1で同定したGL 2-1株を、実施例1（2）に記載のG V褐変化培地100mlを用いて、同様の培地組成、培養条件下で培養した。

培養後、培養液をフィルターでろ過して菌糸体を回収し得られた菌糸体0.6gに1mM DTTを含む0.1M Tris-HCl緩衝液（pH8.0）を加えて懸濁し、続いてミニビードビータ（ガラスピーブ0.5mm）により菌糸体を破碎後、遠心分離（4°C、10,000×g、10min）し、上清を無細胞抽出液とした。

### 【0033】

##### 2) 硫安分画

1) 得た無細胞抽出液を、硫酸アンモニウム濃度30~80%飽和画分を1mMのDTTを含む50mM Tris-HCl緩衝液（pH8.0）に溶解し、同緩衝液で一晩透析した。

### 【0034】

##### 3) Resource Qカラムクロマトグラフィー

以下の条件で透析後の硫安画分のクロマトグラフィーを行った。

##### 分析条件

カラム（容量）： Resource Qカラム（1ml）（アマシャムバイオシステ

ムズ社製)

流速 : 1 ml/min

緩衝液A : 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) + 1 mM D

TT

緩衝液B : 緩衝液A + 1 M NaCl

溶出条件

0~5 min : 緩衝液B 0%

5~35 min : 緩衝液B 0~50%

35~40 min : 緩衝液B 50~100%

Resource Qカラムクロマトグラフィーにおけるタンパク (OD = 280 nm) と活性の溶出パターンを図1に示す。FVを基質としたFAO活性で活性をモニターしたところ、2つの画分 (Q1、Q2) に反応性が認められた。活性の測定は実施例1(3)に記載の方法に準じて行った。これらの画分に含有されるFAOをFAO-Q1、FAO-Q2と呼称する。

### 【0035】

#### 【表1】

表 1 精製段階による活性の変化

| 工程            | total unit(U)      | 比活性 (U/mg)   | 収率 (%)  |
|---------------|--------------------|--------------|---------|
| 無細胞抽出液        | 0.5                | 0.019        | 100     |
| 30~80%硫酸分画透析後 | 0.3                | 0.0199       | 60      |
| Resource Q    | Q1 0.22<br>Q2 0.03 | 0.3<br>0.067 | 44<br>6 |

### 【0036】

#### (2) FAO-Q1およびFAO-Q2の基質特異性の比較

上記の(1)、(3)で分離した2つの画分に含有される酵素 (FAO-Q1, FAO-Q2) の基質特異性を調べた。酵素液として、上記2つの画分を用い、実施例1(3)に記載の方法に従って、FAO活性を測定した。基質として、F

V、F VH、F VHL、F VL、F VLS、F ZLを用いた。結果を表2に示す。

### 【0037】

【表2】

表 2 FAO-Q1、FAO-Q2の基質特異性

| 相対活性 (%) |        |        |
|----------|--------|--------|
|          | FAO-Q1 | FAO-Q2 |
| F V      | 100    | 100    |
| F VH     | n.d.   | 2.4    |
| F VHL    | n.d.   | 0.6    |
| F VL     | 1.1    | 0.6    |
| F VLS    | n.d.   | 3.3    |
| F ZL     | 108    | n.d.   |

F V：フルクトシルバリン、F VH：フルクトシルバリンーヒスチジン、F VHL：フルクトシルバリンーヒスチジンーロイシン、F VL：フルクトシルバリンーロイシン、F VLS：フルクトシルバリンーロイシンーセリン、F ZL：フルクトシルN- $\alpha$  Zリジン

n.d.：検出せず

表2から、FAO-Q1はF VおよびF ZLの両方に同程度の活性を有し、かつF VLにも活性を示すこと、FAO-Q2はF Vには活性があるがF ZLには活性を示さず、F VH、F VHLというN-末端バリンが糖化されたペプチドにも活性を示すことが明らかである。

### 【0038】

#### (3). Km値の測定

F VまたはF ZLを基質として、実施例1(3)に記載の方法に従い、FAO-Q1およびFAO-Q2の存在下で測定し、F VまたはF ZLに対するKm値(ミカエリス定数)を求めた。結果を表3に示す。

### 【0039】

## 【表3】

表3 FAO-Q1およびFAO-Q2のFV若しくはFZLに対するKm値

|     | FAO-Q1 | FAO-Q2 |
|-----|--------|--------|
| FV  | 0.62   | 0.64   |
| FZL | 0.56   | n. d.  |

n. d. 検出せず

FVに対するKm値は、FAO-Q1、FAO-Q2でほぼ同程度であった。一方、FAO-Q1のFZLに対するKm値はFVに対するKm値より小さく同酵素は、FVに比べてFZLに対する親和性が高いことが分った。

## 【0040】

## (4) 分子量の測定

## 1) SDS電気泳動法による測定

常法に従ってSDS電気泳動法（ゲル濃度10～15w/v%のグラジエントゲル使用）により分子量の測定を行った。分子量既知の標準蛋白質としてアマシヤムバイオシステムズ社製の分子量マーカー（ホスホリラーゼb 97kDa、牛血清アルブミン 68kDa、オボアルブミン 45kDa、カルボニックアントヒドラーゼ 32kDa、トリプシンインヒビター 20.1kDa、 $\alpha$ -ラクトアルブミン 14.4kDa）を使用して測定したところ、FAO-Q1の分子量は約39kDaであり、FAO-Q2の分子量は約49kDaであった。

## 2) ゲルfiltrationによる測定

常法に従ってゲルfiltrationによる分子量の測定を行った。カラムサイズが1×30cmのスーパーデックス200（アマシヤムバイオシステムズ社製）を用い、分子量既知の標準蛋白質として、ロシュ・ダイアグノスティックス（株）社製の分子量マーカー（アルドラーゼ 150kDa、牛血清アルブミン 68kDa、オボアルブミン 45kDa、キモトリプシノーゲンA 25kDa、チトクロームC 12.5kDa）を使用して検量線を作成し、本発明酵素の分子量を算出した。結果を図2に示す。これより、FAO-Q1の分子量は約39.4kDaであり、FAO-Q2の分子量は約58kDaであることが判明した。

## 【0041】

### (5) 部分アミノ酸の解析

N末端アミノ酸配列を決定するため、精製したFAO-Q2酵素を蒸留水に対して透析した後、蛋白量として約40ngをN末端配列分析用の試料とした。N末端配列はプロテインシーケンサー・モデル476A（アプライドバイオシステムズ社製、米国）を用い、N末端から10残基まで分析した。N末端から得られたFAO-Q2の配列は、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列であることが判明した。一方FAO-Q1は、N末端がブロックされており、この方法では決定できなかった。

### 【0042】

#### 【発明の効果】

本発明により新たなフルクトシルアミノキシダーゼが提供され、アマドリ化合物の分析の発展に寄与することができる。特に、本発明のフルクトシルアミノキシダーゼのうち、糖化アミノ酸のみならず糖化ペプチドに対しても活性を有するものは、糖化タンパクの分解が不完全な場合であっても糖化タンパクをより正確に測定することを可能にし、例えば、糖尿病における血糖値コントロールに重要なHbA1cのより正確な測定を可能にし、延いては糖尿病患者に対する治療、合併症の予防に貢献するものである。

### 【0043】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Arkray, Inc.

<120> Fructosyl Amine Oxidase

<130> 186565

<150> JP 2002-277214

<151> 2002-9-24

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 460

<212> DNA

<213> *Fusarium proliferatum*

<400> 1

aactcccaa cccctgtcaa cataccaatt gttgcctcggtt cggatcagcc cgctcccggtt 60  
aaaacgggac ggccgcctaa aggaccctta aactctgtttt ctatatgtaa cttctgagta 120  
aaaccataaa taaatcaaaa cttcaacaa cggatctttt ggttctggca tcgatgaaga 180  
acgcagcaaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattt cgtgaatcat cgaatctttt 240  
aacgcacatt gcgccgcctaa gtattctggc gggcatgcctt gttcgagcgtt catttcaacc 300  
ctcaagcccc cgggtttgggt gttggggatc ggcgagccctt tgccggcaagc cggcccccggaa 360  
atcttagtggc ggtctcgctt cagttccat tgcgttagtag taaaaccctc gcaactggta 420  
cgcggcgcgg ccaagccgtt aaaccccaa cttctgaatg 460

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Fusarium proliferatum*

<400> 2

Ala Arg Thr Val Ala Pro Leu Asn Lys Asp

1

5

10

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 フサリウム プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) の培養物の、Resource Qカラムクロマトグラフィーにおけるタンパク (OD = 280 nm) と活性の溶出パターンを示す図である。

【図2】 FAO-Q1の溶媒中での活性とpHとの関係を示すグラフである。

【図3】 FAO-Q2の溶媒中での活性とpHとの関係を示すグラフである。

【図4】 FAO-Q1の溶媒中での活性と温度との関係を示すグラフである。

【図5】 FAO-Q2の溶媒中での活性と温度との関係を示すグラフである。

【図6】 FAO-Q1およびFAO-Q2のゲルfiltrationによる分子量の測定結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

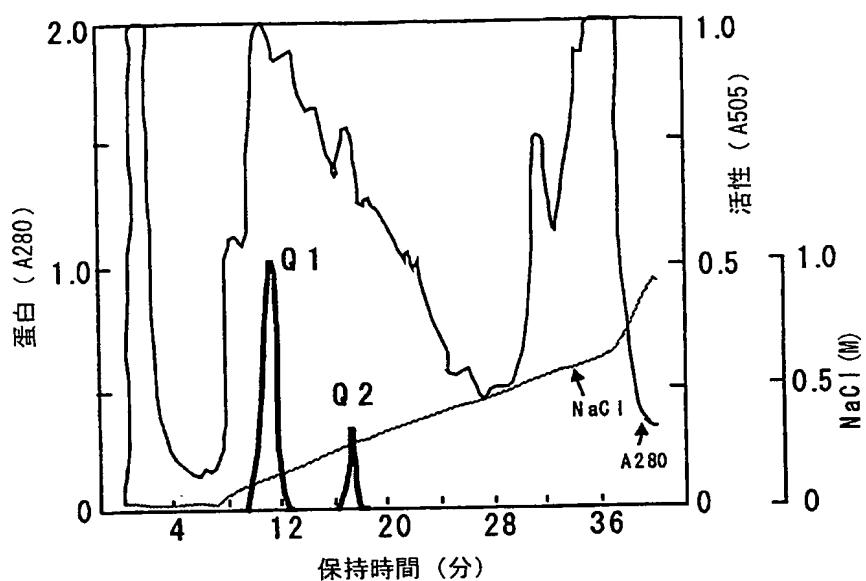
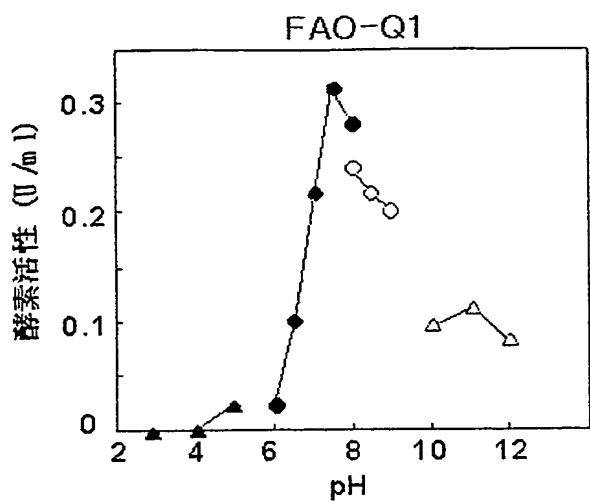
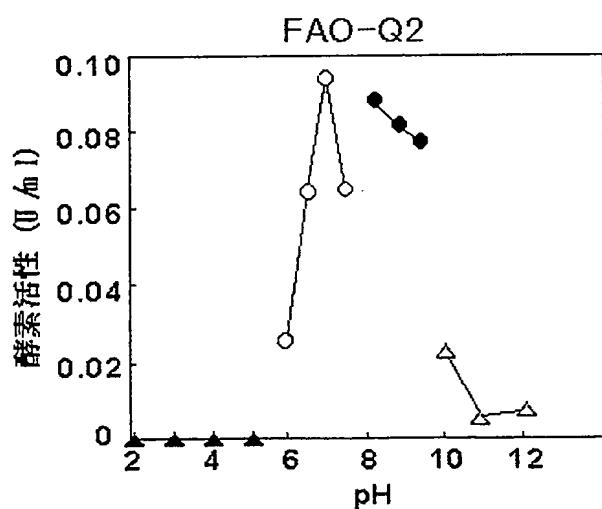


図 1 : Resource Q カラムクロマトグラフィー

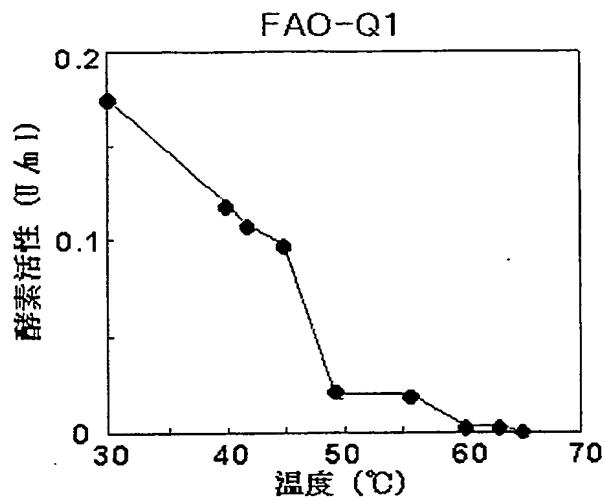
【図2】



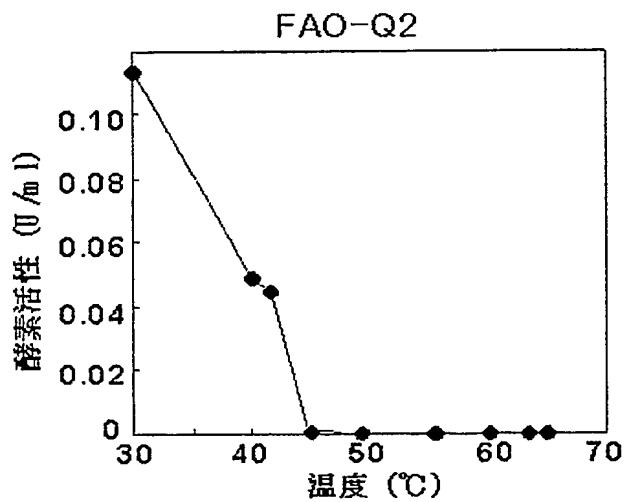
【図3】



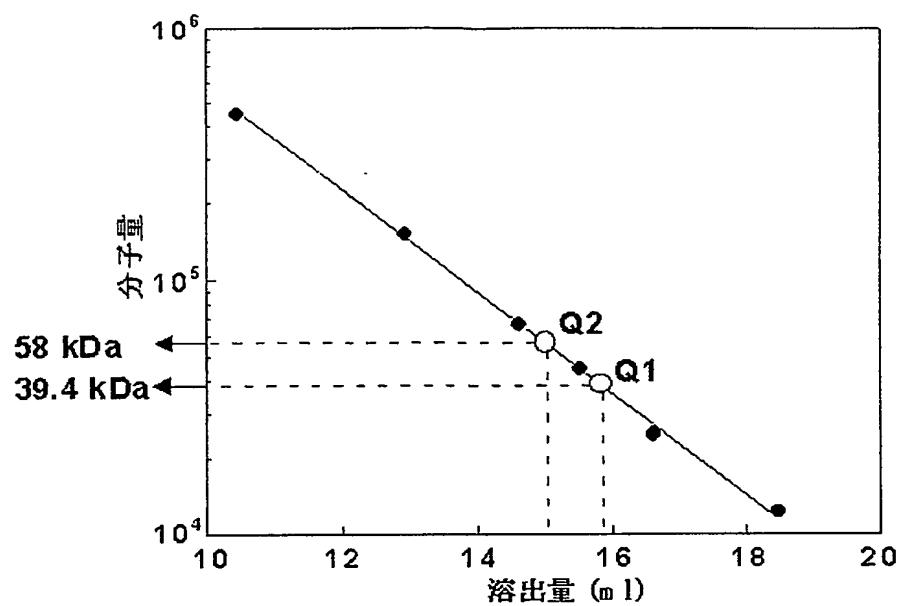
【図4】



【図5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アマドリ化合物の測定に有用なフルクトシルアミンオキシダーゼを提供する。

【解決手段】 フサリウム・プロリフェラタム (*Fusarium proliferatum*) を培養し、培養生成物から得られる基質特異性の異なる2種類のフルクトシルアミンオキシダーゼを精製することにより得ることができる酵素。

【選択図】 なし

特願2002-309734

出願人履歴情報

識別番号 [000141897]

1. 変更年月日 2000年 6月12日

[変更理由] 名称変更

住所 京都府京都市南区東九条西明田町57番地  
氏名 アークレイ株式会社